Étude sur la présence d' « amibes libres » dans les eaux des piscines lyonnaises

par P. PERNIN et A. RIANY

Département de Parasitologie et Pathologie exotique (P^r J. Coudert)
Université Claude-Bernard, 8, avenue Rockefeller, F 69373 Lyon Cedex 2

Résumé.

Près de 90 % des 44 prélèvements d'eau effectués dans 9 piscines lyonnaises renfermaient des amibes. A partir de ceux-ci, 85 souches ont pu être séparées.

Malgré l'extrême diversité des espèces rencontrées, les souches appartenant aux genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella* prédominent. En revanche le genre *Naegleria* paraît exceptionnel : il n'a pu être isolé qu'une seule fois directement à partir de l'eau des bassins.

Summary.

Study on the presence of « free-living » amoebae in the swimming-pools of Lyon.

About 90 % among 44 water samples executed in 9 swimming-pools of Lyon contained amoebae. From these prelevements, 85 strains have been separated.

In spite of the great diversity of the species isolated, the strains belonging to genus *Acanthamoeba* and *Hartmannella* prevail. In return, the genus *Naegleria* seems to be rare : it has been isolated only one time directly from water of swimming-pools.

Introduction

L'intérêt suscité par la pathogénicité de certaines amibes libres nous a amené à réaliser une enquête sur leur présence dans les eaux des piscines lyonnaises (Pernin, 1976).

Accepté le 12 mars 1978.

Au cours de cette étude nous avons effectué un travail d'identification de la population amibienne, ainsi qu'une première approche quantitative. La pathogénicité des souches appartenant aux genres *Naegleria* et *Acanthamoeba*, incriminés chez l'homme, a été testée.

Matériel et méthodes

A) Méthodes pour l'étude qualitative des amibes.

1. Prélèvements.

Tous les prélèvements sont faits à l'intérieur même des bassins de natation sauf trois d'entre eux réalisés à la surface des filtres à sable des piscines.

Les flacons de prélèvements sont au préalable stérilisés à la chaleur sèche 3 heures à 180 °C.

Le volume d'eau analysée correspond chaque fois à 1 litre.

Nous nous sommes efforcés de pratiquer les prélèvements à des moments où l'eau présentait un brassage maximum en raison de la fréquentation importante de la piscine.

2. Isolement des amibes.

Les échantillons d'eau sont soumis dès leur arrivée au laboratoire, à une filtration sur membrane de nitrate de cellulose (porosité 1,2 microns).

La filtration terminée, la membrane est aussitôt découpée en deux : chaque moitié est déposée en la retournant à l'envers, à la surface d'une boîte de Pétri contenant une mince couche de gélose à 15 % enduite d'une suspension d'*Aerobacter aerogenes*.

Les boîtes sont déposées à l'envers dans une étuve à 28 °C. Elles sont examinées à intervalles réguliers à l'aide d'un microscope inversé ($\times 160$) pour surveiller l'apparition éventuelle d'amibes ou d'autres micro-organismes.

Dans ces conditions, la plupart des prélèvements fournissent des mélanges d'espèces différentes généralement repérables avec l'habitude dès le grossissement $\times 160$.

La séparation des souches s'effectue par clonage ; leur identification, quand elle est possible, résulte de l'observation de microcultures sur lame au microscope à contraste de phase (Pussard, 1974).

B) Protocole pour l'étude quantitative de la présence d'amibes.

Le mode de culture sur gélose enrichie de bactéries interdit tout recours à des méthodes de dénombrement direct du type de celles utilisées en bactériologie après ensemencement sur support nutritif solide. En effet, sur un tel milieu, les amibes ne se développent jamais en colonies isolées à la manière des bactéries. La pousse a souvent lieu sous la forme d'une ligne de front continue, au niveau de laquelle les formes végétatives en phase de multiplication active apparaissent très resserrées et absolument impossibles à distinguer les unes des autres.

Même lorsque l'envahissement de la gélose se produit sous forme de cellules dispersées, le nombre même de ces dernières rend illusoire toute tentative de comptage. De plus, certaines amibes passeraient inaperçues, cachées par la membrane de filtration, ou même quelquefois, par l'épaisseur de l'enduit bactérien.

La réponse donnée à la présence d'amibes dans un volume d'eau déterminé ne peut donc être que qualitative : présence ou absence d'au moins une amibe dans le volume considéré selon que l'on constate la positivité ou la négativité de la pousse amibienne sur la boîte ensemencée.

Il est donc nécessaire d'utiliser une méthode de dénombrement indirect par calcul statistique, par analogie avec les méthodes bactériologiques d'ensemencement en milieu de culture liquide où le type de réponse obtenue ne peut être qu'affirmatif ou négatif. Le choix d'un tel protocole apparaît à première vue paradoxal puisque nous travaillons avec un milieu solide, mais se trouve en fait justifié comme nous l'avons indiqué.

Nous avons eu recours à un système d'évaluation par méthode statistique du nombre le plus probable (N.P.P.) dont les Tables figurent dans l'ouvrage de Rodier (1975).

Parmi les différents protocoles proposés par cet auteur, nous avons retenu le système d'ensemencement n° 4 qui requiert la répartition suivante pour un seul essai quantitatif : 1 fois 50 ml ; 5 fois 10 ml ; 5 fois 1 ml.

Ne pouvant envisager d'ensemencer directement sur les boîtes de Pétri, les deux premières séries de volumes trop importants, nous traitons ces échantillons par filtration, selon le processus habituel. Les 5 derniers inoculats de 1 ml sont ensemencés directement sur les boîtes.

Après ensemencement les boîtes sont scellées au « Parafilm », placées à l'envers dans une étuve à 28 °C. Avant de conclure à la positivité ou à la négativité des échantillons, chaque boîte doit être régulièrement examinée pendant 3 ou 4 semaines. Le nombre d'amibes le plus probable au litre, est alors donné en fonction du nombre de boîtes de Pétri positives, en se reportant à la Table de probabilité qui correspond au système d'ensemencement choisi (Rodier, p. 26).

Nous avons retenu à priori ce système en raison de la bonne précision et de l'étagement suffisant donnés par la Table dans la zone des faibles pollutions.

Enfin, d'un point de vue pratique, nous ferons remarquer qu'un seul prélèvement pour analyse quantitative, représente l'utilisation de 6 filtres différents, l'ensemencement, puis la surveillance de 11 boîtes distinctes. L'obtention d'un seul renseignement quantitatif est donc relativement accaparante.

Résultats

A) Positivité des prélèvements.

Nous avons effectué un total de 44 prélèvements dans 9 piscines différentes de l'agglomération lyonnaise entre les mois de mars 1974 et d'août 1975.

Les établissements se répartissent de la façon suivante :

- 4 piscines couvertes ou « d'hiver »,
- 3 piscines à ciel ouvert ou « d'été »,
- 2 piscines fonctionnant sur les deux modes, tout au long de l'année.

Sur ces 44 échantillons d'eaux de bassins, 39 se sont avérés positifs quant à la présence d'amibes, soit 88,6 % (tableau I).

Tableau 1. Comparaison des résultats obtenus entre piscines d'hiver et piscines d'été.

Nombre de prélèvements	20	24	44
Prélèvements positifs	17	22	39
Nombre total de souches	27	58	85
Nombre moyen de souches par prélèvement	1,3	2,4	$t = 2,9$ significatif au risque 1 %

Dans tous les établissements des prélèvements se sont en définitive révélés positifs.

Ces résultats prouvent la présence quasi constante d'amibes « libres » dans les eaux des piscines, ainsi que l'inefficacité des mesures actuelles de nettoyage et de chloration pour empêcher leur développement. Ils corroborent pleinement ceux publiés par les Belges : Desmet-Paix et Fisch-Thiébaud (1975), réalisant 95 prélèvements dans 20 piscines, isolent des amibes dans 80 % des cas.

B) Dénombrement et recensement des souches.

En recensant pour les bassins « d'hiver » et « d'été », le nombre des souches d'espèces différentes isolées dans chacun des prélèvements, on aboutit à un total de 85 souches d'amibes pour l'ensemble des 44 échantillons.

La comparaison des deux types de bassins montre une plus grande diversité des souches d'amibes dans les piscines « d'été ».

En effet, on isole en moyenne :

- $27/20 = 1,3$ souches d'amibes par prélèvement d'un litre dans les piscines couvertes « d'hiver » ;
- contre $58/24 = 2,4$ souches par prélèvement d'un litre en piscines « d'été ».

La comparaison de ces deux moyennes montre une différence significative entre piscine « d'été » et piscine « d'hiver ». (Le test du « *t*-Student » donne pour « *t* » la valeur de 2,89 qui avec un d.d.l. = 42 est significative : $p < 0,01$.)

On peut penser que cette différence dans le nombre moyen de souches isolées traduit une plus grande richesse en amibes des eaux de piscines « d'été ». Celle-ci résulterait d'une pollution plus importante en cette saison. Elle dépend probablement de plusieurs facteurs jouant dans le même sens : fréquentation plus importante des bassins d'été ; contamination par les poussières atmosphériques susceptibles de véhiculer des kystes amibiens sur ces bassins à ciel ouvert ; enfin chloration plus difficile à assurer du fait de l'évaporation plus importante l'été.

Nos résultats reflètent bien cette diversité puisque 8 prélèvements réalisés dans des bassins à ciel ouvert renferment 3 ou 4 souches différentes d'amibes et qu'en outre, 2 prélèvements contiennent respectivement 5 et 6 souches.

C) Fréquence et abondance des souches pour chaque genre.

L'étude microscopique en contraste de phase des souches afin de les identifier, permet d'établir le nombre de souches isolées pour chaque genre d'amibes, ou pour un type morphologique donné lorsque la détermination du genre s'avère délicate (cf. *tableau II*).

Tableau II. Répartition des souches selon les genres

	Souches	Piscines d'hiver	Piscines d'été	Fréquence (% des souches)
Amibes de type « limax »	<i>Hartmannella</i> sp.	5	16	37,7 %
	<i>Saccamoeba</i> sp.	2	3	
	<i>Vahlkampfia</i> sp.	—	5	
	<i>Naegleria gruberi</i>	—	1	
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	7	6	24,7 %
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	5	2	
	<i>Acanthamoeba pustulosa</i>	—	1	
Amibes de type « flabellulien »	<i>Vannella</i> sp.	1	2	22,4 %
	Souches indéterminées	—	16	
Amibes de type « filosa »	<i>Nuclearia simplex</i>	—	2	5,9 %
	<i>Filamoeba nolandii</i>	2	1	
Souches diverses	<i>Vexillifera bacillipedes</i>	1	—	9,4 %
	Souches indéterminées	4	3	
	Total	27	58	

Malgré l'imprécision à l'égard de certains types d'amibes difficiles à déterminer, on peut néanmoins retirer de ces résultats quelques renseignements sur le « peuplement amibien » des piscines.

En prenant uniquement les genres en considération on remarque que les amibes appartenant aux genres *Hartmannella* et *Acanthamoeba* sont à la fois les plus fréquentes par rapport aux prélèvements et les plus abondantes parmi les souches isolées. Ainsi le genre *Hartmannella* apparaît dans 20 de 44 prélèvements et représente 21 souches sur 85. Quant aux *Acanthamoeba*, nous les retrouvons dans 15 des 44 prélèvements et elles rassemblent 21 souches qui se répartissent de la façon suivante :

- 13 souches d'*Acanthamoeba polyphaga* ;
- 7 souches d'*Acanthamoeba castellanii* ;
- 1 souche particulière décrite comme une espèce nouvelle par Pussard et Pons (1977) : *Acanthamoeba pustulosa*.

Nous avons constaté à plusieurs reprises la présence simultanée des deux espèces *A. castellanii* et *A. polyphaga* dans différents prélèvements.

La fréquence de cette association nous paraît remarquable sans qu'il soit possible pour l'instant de lui trouver une explication.

Par contre nous n'avons pu isoler qu'une seule fois des *Naegleria* parmi les 85 souches isolées à Lyon.

Cette souche ne s'est pas montrée pathogène et n'a pu être cultivée axéniquement : il s'agit d'une *Naegleria gruberi*. Le genre *Naegleria* est donc exceptionnel et ne représente que 1,2 % de nos souches.

Cette prédominance des amibes appartenant aux genres *Hartmannella* et *Acanthamoeba* d'une part, et la rareté relative des amibes du genre *Naegleria* d'autre part se retrouvent dans les travaux de Cerva (1971) en Tchécoslovaquie, de Desmet-Paix (1975) en Belgique et de Molet et coll. (1976) en France.

En plus de ces échantillons d'eaux provenant directement des bassins, nous avons pratiqué à trois reprises des prélèvements au-dessus des filtres à sable des piscines : deux d'entre eux ont permis d'isoler des souches de *Naegleria gruberi*.

Faut-il en conclure que les amibes du genre *Naegleria* se rencontrent préférentiellement au niveau des filtres plutôt que dans l'eau des bassins ?

Cette éventualité peut se concevoir si l'on se réfère aux travaux de Derreumaux et coll. (1973) qui ont montré que *Naegleria* était plus sensible au chlore qu'*Acanthamoeba*. Si l'on est en droit d'admettre un taux de chlore efficace dans l'eau des bassins, il est par contre probable que celui-ci est très réduit, voire même nul, au-dessus des filtres à sable en fin de circuit : ainsi s'expliqueraient à la fois la rareté du genre *Naegleria* dans l'eau des bassins et son développement préférentiel au niveau des filtres.

L'absence de systématique complète et définitive des amibes ne permet pas une identification précise de toutes les souches isolées au cours de cette enquête. Si on considère uniquement les grands types morphologiques rencontrés, ce qui correspond à une analyse plus approximative, on se rend compte que les amibes du type « limax » ne sont pas les seules isolées dans les piscines. Il est au contraire frappant de constater l'étonnante diversité de genres et d'espèces auxquels notre analyse est confrontée.

Le terme d'amibes « limax » évoque de façon très schématique et sommaire l'attitude prise par certaines amibes durant leur locomotion. Il vient d'être redéfini de manière plus précise par Page (1974). D'après cet auteur il faut regrouper sous cette expression les genres *Hartmannella* et *Saccamoeba* (*Hartmannellidae*) d'une part, et *Vahlkampfia* et *Naegleria* (*Vahlkampfiidae*) d'autre part (fig. 1 et 2).

Dans ces conditions les amibes de type « limax » prédominent effectivement : les 4 genres précités regroupent 32 souches sur 85 et apparaissent dans 25 prélèvements sur 44 (cf. tableau II).

Fig. 1 à 4. Différents types d'amibes isolées en piscine. (Microphotographies prises en contraste de phase sur le vivant. Grossissement $\times 1\,500$ sauf fig. 4 $\times 945$).

Fig. 1 et 2 : Type « limax » ; 1 : *Saccamoeba* sp. ; 2 : *Vahlkampfia* sp.

Fig. 3 : Type « Flabellulien » : *Vannella* sp.

Fig. 4 : Amibe à Filopodes : *Nuclearia simplex*.

le. : Lambe ectoplasmique, n. : nucléole, v.p. : vacuole pulsatile.

Mais on peut opposer à ce type « limax » fréquent, un autre type morphologique de conception aussi générale que lui, qui renferme, comme lui, des genres et même des familles très disparates chez lesquelles on observe cependant des points communs. Il s'agit des amibes de type « flabellulien » (1). Cet aspect rassemble des souches qui s'étalent en principe largement sur le substrat. La délimitation est très nette entre l'ectoplasme qui forme une lame d'allure flabelliforme déployée à l'avant, et l'endoplasme granuleux, plus épais rejeté à l'arrière (fig. 3).

D'après nos résultats ce groupe occupe une position non négligeable puisqu'il rassemble 19 souches sur 85, soit 22,4 % des souches, et qu'on le retrouve dans 16 des 44 prélèvements (cf. tableau II).

Enfin, nous avons pu isoler un troisième groupe très différent des précédents : il s'agit d'amibes de type « filosa », très caractéristiques en raison de leur pseudopodes filamenteux (cf. tableau II ; fig. 4).

D) Approche quantitative.

Peu d'enquêtes systématiques ont été entreprises pour déterminer l'aspect quantitatif de la présence d'amibes dans les eaux. Le plus souvent les auteurs signalent simplement la présence d'amibes dans l'eau analysée, mais sans précision numérique (Jadin, 1972 et 1974).

La plupart des chiffres dont nous disposons résultent d'essais de sondage dispersés. Les premières tentatives de dénombrement ont été effectuées par Cerva (1971) qui rapporte, pour la piscine d'Usti, un chiffre d'amibes compris le plus souvent entre 100 et 1 000 amibes au litre et atteignant même, à une occasion, 10 000 amibes au litre.

Selon Hermanne et coll. (1972) le chiffre de 1 000 amibes au litre représente pour un bassin, un indice de pollution importante qui devrait entraîner sa fermeture.

Plus récemment, à Stockholm, Cerva et Huld (1974) ont pu noter les chiffres suivants dans cinq piscines différentes de la ville : 10, 10, 700, 120, 100 amibes par litre prélevé.

Enfin, à Anvers, Desmet-Paix et Thiébaud (1975), effectuant à plusieurs mois d'intervalle trois essais quantitatifs dans le même bassin, et au même point, obtiennent les teneurs suivantes en amibes par litre : 30, 25, 9.

Puisque le nombre de souches isolées semble indiquer une présence d'amibes plus importante dans les piscines d'été que dans les piscines d'hiver, nous avons entrepris des essais quantitatifs sur ces deux types de bassin pour les comparer, avec l'espoir de traduire la différence éventuelle par des données numériques.

Nous avons d'une part, pratiqué 10 prélèvements dans cinq piscines couvertes,

(1) Le type « flabellulien » correspond à plusieurs genres de délimitation incertaine et malaisée qui sont classés par Page (1976) dans les familles des *Thecamæbidae* : *Thecamæba*, *Sappinia*, *Platyamæba*, *Pessonnella*, *Vannella* ; des *Flabellulidae* : *Flabellula*, *Rosculus* ; des *Hyalodiscidae* : *Hyalodiscus*, *Flamella*.

à raison de 2 prélèvements par piscine effectués à plusieurs jours d'intervalle (piscines de Vénissieux, VE, Bron, Br, INSA, IN, Lumière, LU, et piscine municipale de Lyon, GA : *tableau III*).

D'autre part, nous avons commencé au cours de l'été 1976 une série de prélèvements en piscines à ciel ouvert. En fait nous n'avons pu en réaliser que 4 (Rhône, RH, Vénissieux, VE, Bron, BR, Mermoz, ME : *tableau III*).

Tableau III. Nombre le plus probable et intervalle de confiance dans le cas du système d'ensemencement n° 4 (Rodier, 1975)

Piscines d'hiver	Nombre de boîtes donnant une réaction positive sur :			Amibes au litre N. P. P.	Limites de confiance à 95 %	
	1 boîte de 50 ml	5 boîtes de 10 ml	5 boîtes de 1 ml		Inf.	Sup.
Premiers prélèvements						
VE	0	2	0	20	< 5	60
BR	0	0	0	< 10		
IN	1	1	0	30	< 5	80
GA	0	0	0	< 10		
LU	0	0	0	< 10		
Seconds prélèvements						
VE	1	3	1	110	30	260
BR	0	1	0	10	< 5	40
IN	0	0	0	< 10		
GA	0	0	0	< 10		
LU	0	0	0	< 10		
Piscines d'été						
RH	1	2	1	70	10	170
VE	1	1	1	50	< 5	130
BR	0	1	0	10	< 5	40
ME	0	0	0	< 10		

Les résultats consignés dans le tableau III montrent que le nombre de prélèvements effectués dans les piscines d'été n'est pas suffisant pour que l'on puisse tirer de la comparaison avec les chiffres obtenus dans les piscines d'hiver, une conclusion définitive.

Néanmoins, ces premières données semblent confirmer l'impression qui se dégageait lors du dénombrement des souches, à savoir que la pollution amibienne est plus importante en été. En effet, sauf dans le cas où le nombre le plus probable d'amibes est de 110 au litre, dans les piscines d'hiver il se situe le plus souvent au-dessous de 10 amibes par litre. Par contre, toutes réserves étant faites sur le petit nombre d'échantillons analysés, le N.P.P. dans les piscines d'été paraît plus

élevé puisque dans 2 des 4 prélèvements, nous avons dénombré 50 et 70 amibes par litre.

Quoi qu'il en soit, tous nos prélèvements se situent nettement au-dessous du seuil de 1 000 amibes au litre considéré par Hermanne comme un signe d'alarme.

Il y aurait donc lieu, apparemment, de se montrer à priori satisfait et de croire à l'efficacité du traitement des eaux tel qu'il est effectué. A la vue de ces quelques essais quantitatifs on pourrait se demander si l'on n'a pas dramatisé la question.

En fait, nous pensons qu'il vaut mieux rester circonspect plutôt que d'afficher un optimisme de circonstance car bien des exemples prouvent qu'actuellement, dans le domaine des amibes libres il vaut mieux rejeter toute idée préconçue.

Ainsi, *Naegleria fowleri*, souche pathogène, n'a jamais pu être isolée d'aucune eau de piscine malgré les efforts de Jadin en Belgique : 5 cas mortels ; et ceux de Cerva en Tchécoslovaquie : 16 cas mortels dans la piscine d'Usti (1968 *a* et *b*).

En outre les résultats que nous avons obtenus en procédant à l'inoculation à la Souris des souches appartenant aux deux genres incriminés chez l'homme, suffisent pour se convaincre de la réalité du problème.

Si certes, aucune de nos trois souches de *Naegleria* ne s'est révélée pathogène, par contre, sur 13 souches d'*Acanthamoeba* axénisées, 8 ont entraîné la mort des souris après instillation nasale. L'étude des modalités de ce pouvoir pathogène, déjà entreprise (Pernin, 1976), sera traitée dans une autre publication.

Conclusion

Notre enquête confirme la présence quasi constante d'amibes libres dans les eaux de piscines. Elle permet de préciser d'autre part la fréquence des principaux genres rencontrés. Mais la rareté des amibes du genre *Naegleria* dans ces eaux ne doit pas laisser sous-estimer le problème : il serait en effet inconsideré de conclure que le rôle pathogène des « amibes libres » chez l'homme est limité exclusivement à ce genre.

De nombreuses souches d'*Acanthamoeba* manifestent également la faculté de passer d'un état de vie libre naturel à un mode de vie parasitaire. Depuis la découverte de Culbertson (1959) la pathogénicité du genre *Acanthamoeba* est de plus en plus souvent rapportée aussi bien sur le plan expérimental chez l'animal (Culbertson, 1965 et 1966 ; Kasprzak et Mazur, 1972 ; Martinez et coll., 1975) que chez l'homme où les *Acanthamoeba* peuvent être responsables d'un syndrome de M.E.A.P. d'évolution particulière (Patras et Andujar, 1966 ; Calicott et coll., 1968 ; Jager et Stamm, 1972 ; Robert et Rorke, 1973 ; Bhagwande et coll., 1974 ; Ringsted et coll., 1976), ou associées à des affections diverses de l'œil (Nagington et coll., 1974) ou de l'oreille (Jakovljevic et Talis 1969).

Les amibes du genre *Acanthamoeba* représentent donc un danger latent pour les baigneurs si l'on tient compte d'une part de ces faits, et d'autre part de leur présence fréquente dans les eaux de piscine : 24,7 % des souches isolées.

Bibliographie

- Bhagwande S. B., Carter R. F., Naik B. S., Levitt D. (1974): A case of hartmannellid amoebic meningoencephalitis in Zambia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 63, 483-492.
- Callicott J. H., Jones M. M., Nelson E. C., Dos Santos J. C., Utz J. P., Duma R. J., Morris J. V. (1968): Meningoencephalitis due to free-living amoeba. *A. J. Med. Assoc.*, 206, 579-582.
- Cerva L., Novak K., (1968 a): Amoebic meningoencephalitis: sixteen fatalities. *Science*, 160, 92.
- Cerva L., Novak K., Culbertson C. G. (1968 b): An outbreak of acute fatal amoebic meningoencephalitis. *Am. J. Epidemiol.*, 88, 436-444.
- Cerva L. (1971): Studies of limax amoebae in a swimming-pool. *Hydrobiologia*, 38, 141-161.
- Cerva L., Hultdt G. (1974): Limax amoebae in five swimming-pools in Stockholm. *Folia Parasitol.*, 21, 71-75.
- Culbertson C. G., Smith J. W., Cohen H. K., Minner J. R. (1959): Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.*, 35, 185-197.
- Culbertson C. G., Ensminger P. W., Overton W. M. (1965): The isolation of additional strains of pathogenic *Hartmannella* sp. (*Acanthamoeba*). Proposed culture method for application to biological material. *Am. J. Clin. Pathol.*, 43, 383-387.
- Culbertson C. G., Ensminger P. W., Overton W. M. (1966): *Hartmannella* (*Acanthamoeba*): experimental chronic granulomatous brain infections produced by new isolates of low virulence. *Am. J. Clin. Pathol.*, 46, 305-314.
- Derreumaux A. L., Jadin J. B., Willaert E., Moret R. (1973): Action du chlore sur les amibes de l'eau. C.R. coll. Intern. sur la Méningoencéphalite amibienne primitive et les amibes libres. *Institut Prince Léopold*, Anvers, B 2 000, p. 191-204.
- Desmet-Paix L., Fisch-Thiébaud C. (1975): La présence d'amibes dans les piscines couvertes. Note d'orientation. *Laboratoire Intercommunal Chimie et Bactériol.*, Bruxelles.
- Hermanne J., Jadin J. B., Martin J. (1972): Méningoencéphalite amibienne primitive en Belgique: à propos de deux cas. *Ann. Pédiatr.*, 19, 425-436.
- Jadin J. B., Willaert E., Compère F. (1972): De la nécessité du contrôle biologique des eaux potables. *Bull. Acad. Nat. Med. Paris*, 156, 520-526.
- Jadin J. B. (1974): Les amibes dans les eaux. *Pathol. Biol.*, 22, 81-87.
- Jager B. V., Stamm W. P. (1972): Brain abscesses caused by free-living amoebae probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet*, 1343-1345.
- Jakovljevic R., Talis B. (1969): Recovery of a hartmannellid amoeba on the purulent discharge from a human ear. *J. Protozool.*, 16, (Suppl.), 36.
- Kasprzak W., Mazur T. (1972): Free-living amoebae isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznan, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. *Z. Tropen Med. Parasitol.*, 23, 391-398.
- Martinez A. J., Markowitz S. M., Duma R. J. (1975): Experimental pneumonitis and encephalitis caused by *Acanthamoeba* in mice: pathogenesis and ultrastructural features. *J. Infect. Dis.*, 131, 692-699.
- Molet B., Derr-Harf C., Schreiber J. E., Kremer M. (1976): Etude des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. Résultats préliminaires. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, 51, 401-406.
- Nagington J., Waston P. G., Playfair T. J., Mac Gill J., Steele A. D. (1974): Amoebic infection of the eye. *Lancet*, 2, 1537-1540.
- Page F. C. (1974): A further study of taxonomic criteria for «limax» amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.*, 116, 149-184.
- Page F. C. (1976): A revised classification of the *Gymnamoebia* (Protozoa, Sarcodina). *Zool. J. Linn. Soc.*, 58, 61-77.
- Patras D., Andujar J. J. (1966): Meningoencephalitis due to *Hartmannella* (*Acanthamoeba*). *Am. J. Clin. Pathol.*, 46, 226-233.

- Pernin P. (1976): Recherche et essai d'identification par microscopie en contraste de phase des amibes libres des Piscines lyonnaises. Etude de la pathogénicité des souches de *Naegleria* sp. et d'*Acanthamoeba* isolées. Thèse de doctorat d'état en Pharmacie, Lyon, 257 p.
- Pussard M. (1974): La morphologie des amibes libres: intérêt et principes d'étude. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 54, 249-257.
- Pussard M., Pons R. (1977): Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 13 (sous presse).
- Ringsted J., Jager B. V., Suk D., Visvesvara G. S. (1976): Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a korean child. *Am. J. Clin. Pathol.*, 66, 723-730.
- Robert V. B., Rorke L. B. (1973): Primary amebic encephalitis from *Acanthamoeba*. *Ann. Intern. Med.*, 79, 174-179.
- Rodier J. (1975): L'analyse de l'eau. Tome II, *Dunod* édit., Paris, 363 p.
-